



УДК 615.32.072

Исследование аминокислотного состава извлечений из растительных объектов методом двумерной ТСХ

Тринеева О.В., Синкевич А.В., Сливкин А.И., Сафонова Е.Ф.

ФГБОУ ВПО «Воронежский государственный университет», Воронеж

Поступила в редакцию 20.01.2014 г.

Аннотация

На примере плодов облепихи крушиновидной и листьев крапивы двудомной показана возможность разделения и идентификации аминокислот в водных извлечениях из лекарственного растительного сырья методом двумерной хроматографии в тонком слое сорбента.

Ключевые слова: аминокислоты, плоды облепихи высушенные, листья крапивы двудомной, двумерная тонкослойная хроматография.

On the example of the fruits of *Hippophaes rhamnoides* and nettle leaves the possibility of separation and identification of aminoacids in aqueous extracts of medicinal plants by two-dimensional thin-layer chromatography sorbent.

Keywords: aminoacids, fruit of *Hippophaes rhamnoides* dried, nettle leaves, two-dimensional thin layer chromatography

Введение

Повышение требований к качеству лекарственного растительного сырья (ЛРС) приводит к необходимости количественного определения основных классов биологически активных веществ (БАВ), одним из которых являются аминокислоты (АК), важность которых для живого организма трудно переоценить. Имея широкий спектр фармакологического действия и способность усиливать биодоступность других веществ, АК привлекают к себе все больше внимания исследователей в качестве лекарственных средств [1].

Современная фармацевтическая промышленность выпускает большое количество препаратов, биологически активных добавок на основе АК (метионин, церебролизин, аминалон, глицин и др.). Кроме белков, из АК образуется большое количество веществ небелковой природы, выполняющих специальные функции. К ним относятся холин, таурин, гемм, гормоны щитовидной железы, катехоламины - адреналин и норадреналин, серотонин и др. [2-4].

Одним из важнейших требований к аминокислотным препаратам является наличие в их составе незаменимых АК. В растениях в свободном или связанном состоянии содержится до 30 % АК (в пересчете на белок), обладающих высокой биологической активностью и влияющих на эффективность действия на организм растительного сырья и полученных из него препаратов [2-5]. В отличие от животных, растения способны синтезировать все АК, необходимые для построения

белковых молекул, поэтому изучение качественного и количественного содержания АК в ЛРС и полученных из него препаратов имеет большое практическое значение и определенный научный интерес [4].

Целью настоящего исследования являлась разработка методики разделения и идентификации свободных АК в ЛРС методом двумерной ТСХ на примере листьев крапивы двудомной и плодов облепихи крушиновидной.

Эксперимент

Объектом исследования являлось измельченное высушенное ЛРС крапивы двудомной отечественного производителя, соответствующее требованиям НД, а также высушенные плоды облепихи крушиновидной, собранные в Воронежской области в период полного созревания, согласно правилам заготовки данного вида ЛРС. Сушку плодов производили при $t = 60^{\circ}\text{C}$ до остаточной влажности не более 20%.

Получение извлечения из листьев крапивы двудомной: Около 2.5 г измельченного сырья (точная навеска) с размером частиц, проходящих сквозь сито с диаметром отверстий 0.5 мм, помещают в коническую колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 30 мл воды очищенной (с учетом коэффициента водопоглощения сырья). Колбу присоединяют к обратному холодильнику, нагревают на кипящей водяной бане в течение 30 мин, периодически встряхивая для смывания частиц сырья со стенок. Затем колбу с содержимым охлаждают до комнатной температуры. Извлечение фильтруют через несколько слоев марли, отжимая частицы сырья, в мерную колбу вместимостью 25 мл. При необходимости доводят объем до метки водой очищенной.

Получение извлечения из плодов облепихи крушиновидной: Около 10.0 г (точная навеска) высушенных измельченных плодов облепихи крушиновидной помещают в колбу вместимостью 100 мл, заливают 50 мл воды очищенной. Колбу присоединяют к обратному холодильнику, нагревают на кипящей водяной бане в течение 60 мин, периодически встряхивая для смывания частиц сырья со стенок. Затем колбу с содержимым охлаждают до комнатной температуры. Извлечение фильтруют через несколько слоев марли, отжимая ЛРС, в мерную колбу вместимостью 50 мл. При необходимости доводят объем до метки водой очищенной.

Предварительное качественное обнаружение АК проводили по реакции со спиртовым раствором нингидрина. Появление фиолетового окрашивания в исследуемых извлечениях указывало на наличие АК [6]. Нингидриновая проба – цветная реакция на вещества, содержащие первичные и вторичные аминогруппы, и не является специфичной только для АК, а применяется также для определения иминокислот, аминов и др. соединений. Однако, согласно литературным данным [7], основными классами водорастворимых БАВ в исследуемых видах ЛРС являются флавоноиды, дубильные вещества, органические кислоты, хлорофиллы, стеролы, лигнаны и минеральные соли. Плоды облепихи, кроме вышеперечисленных БАВ, содержат значительное количество жирного масла, богатого фосфолипидами (содержат аминогруппы), которые в водную вытяжку не извлекаются. Поэтому, предполагаем, что полученное окрашивание обусловлено присутствием свободных АК.

В эксперименте изучено более пятнадцати типов элюирующих систем в широком диапазоне полярности. Следует отметить, что при однократном элюировании ни одна из изученных систем, рекомендованных в литературе, не

приводила к четкому разделению зон АК на хроматограммах. Проведение двумерного хроматографирования позволило преодолеть данную проблему и решить поставленную задачу. В отличие от одномерной, двумерная ТСХ сопоставима с колоночной хроматографией по разрешающей способности [8]. Наилучшее разделение и качество хроматографических зон было достигнуто в системе н-бутанол-кислота уксусная ледяная-вода (4:1:1) со значением полярности 5.13 [9].

Выбор проявителя осуществляли с учетом таких требований, как специфичность, высокая чувствительность, доступность и высокое качество получаемой картины. Хроматографические пластинки обрабатывали 0,2 % раствором нингидрина в ацетоне, который образует с АК аммонийную соль енольной формы дикетогидринденкетогидринамина, имеющую стойкую сине-фиолетовую окраску [6], нагревали в сушильном шкафу при температуре 105°C в течение 2-3 минут.

Полученные извлечения из исследуемого ЛРС наносили на стартовую линию хроматографических пластин марок «Sorbfil» ПТСХ-П-А размером 10×10 см в количествах 10 и 5 мкл. Хроматографирование проводили в выбранном элюенте в обоих направлениях. Вид полученных хроматограмм представлен на рис. 1 и 2. Для каждой хроматографической зоны были рассчитаны величины относительных скоростей перемещения в тонком слое (R_f), коэффициенты распределения (K) и селективности сорбции (L) (табл. 1). Идентификация зон на хроматограммах проведена в сравнении с достоверными стандартными образцами 0,1% водных растворов АК: аргинин, глицин, глутаминовая кислота, пролин, фенилаланин, метионин, валин, лейцин (ЗАО Вектон, СПб, Россия). Вид двумерной хроматограммы смеси стандартных образцов АК представлен на рис. 3.

Полный аминокислотный состав (свободные и связанные АК) исследуемого ЛРС изучали методом капиллярного электрофореза («Капель-105/105М», «Люмэкс», СПб, Россия), для чего навески образцов гидролизовали 6 М соляной кислотой при температуре 110±5 °С в течение 16-18 часов [10]. Метод основан на получении из свободных форм АК фенилизотиокарбамильных производных, дальнейшем их разделении и количественном определении (рис. 4). Условия разделения: буфер 30 мМ фосфатный, 4 мМ β-циклодекстрин (рН 7,4); капилляр ($L_{эфф}/L_{общ} = 65/75$ см, ID=50 мкм); ввод пробы 150 мбар×с; напряжение +25 кВ; УФ-детектирование 254 нм; температура 30°C [11]. Результаты представлены в табл. 2.

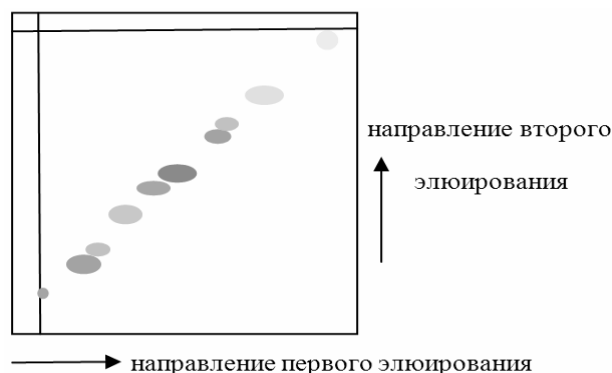


Рис. 1. Вид двумерной хроматограммы извлечения из листьев крапивы двудомной (объем пробы 10 мкл) после проявления 0.2% раствором нингидрина в ацетоне

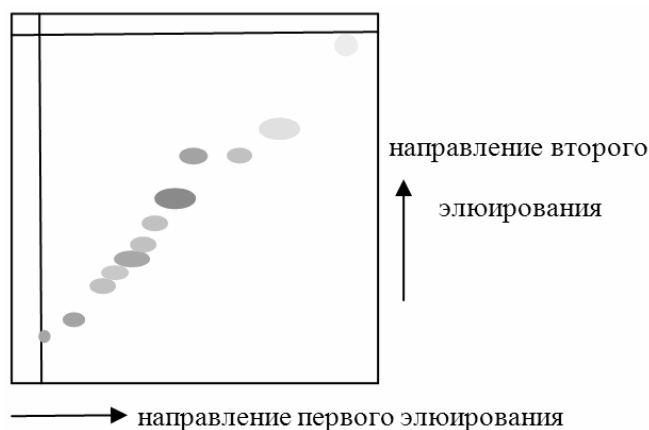


Рис. 2. Вид двумерной хроматограммы извлечения из плодов облепихи крушиновидной (объем пробы 5 мкл) после проявления 0,2% раствором нингидрина в ацетоне.

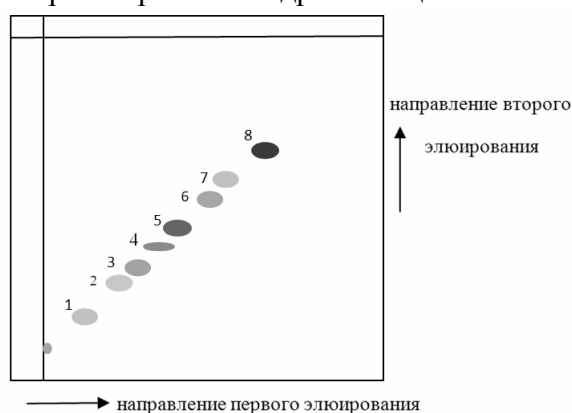


Рис. 3. Вид двумерной хроматограммы смеси стандартных образцов АК после проявления 0,2% раствором нингидрина в ацетоне (1 – аргинин; 2 – пролин; 3 – глицин; 4 – глутаминовая кислота; 5 – валин; 6 – метионин; 7 – лейцин; 8 – фенилаланин).

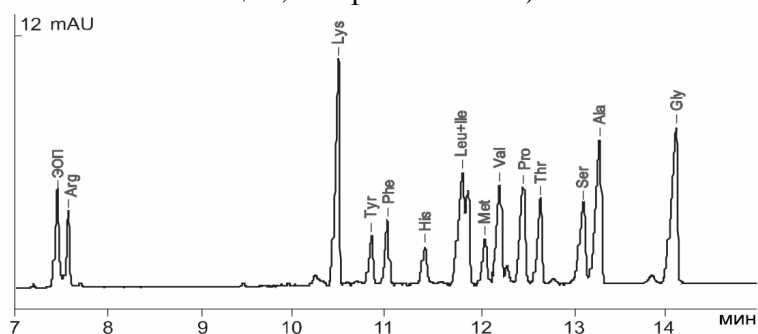


Рис. 4. Электрофореграмма АК, полученная на системе для капиллярного электрофореза «Капель-105/105М»

Обсуждение результатов

Для водного извлечения из листьев крапивы двудомной наблюдалось девять хроматографических зон. При анализе водного извлечения из плодов облепихи обнаружены одиннадцать зон АК. На хроматограммах обнаружены общие зоны АК со значениями величин $R_f = 0.08 \pm 0.02$ (аргинин); 0.26 ± 0.02 (пролин); 0.36 ± 0.02 (глицин); 0.40 ± 0.02 (глутаминовая кислота); 0.48 ± 0.02 (валин), 0.53 ± 0.02 (лейцин) и

0.62±0.02 (фенилаланин), среди которых валин, фенилаланин и лейцин относятся к незаменимым [1-5].

Таблица 1. Идентификация хроматографических зон на хроматограммах

№ зоны	R _f	K	L	Окраска в видимом свете	Идентификация вещества
Смесь стандартных образцов АК					
1	0.08±0.02	10.11	-	розовая	Аргинин
2	0.26±0.02	2.85	2.15	оранжево-розовая	Пролин
3	0.36±0.02	1.78	1.60	малиновая	Глицин
4	0.40±0.02	1.50	1.19	сиреневая	Глутаминовая кислота
5	0.48±0.02	1.08	1.39	розовая	Валин
6	0.50±0.02	1.00	1.08	малиновая	Метионин
7	0.53±0.02	0.89	1.12	розовая	Лейцин
8	0.62±0.02	0.61	1.46	розовая	Фенилаланин
Извлечение из листьев крапивы двудомной					
1	0.08±0.02	10.11	-	розовая	Аргинин
2	0.14±0.02	6.14	1.65	розовая	Неидентифицированная зона
3	0.26±0.02	2.85	2.15	оранжево-розовая	Пролин
4	0.36±0.02	1.78	1.60	малиновая	Глицин
5	0.40±0.02	1.50	1.19	сиреневая	Глутаминовая кислота
6	0.48±0.02	1.08	1.39	розовая	Валин
7	0.53±0.02	0.89	1.21	розовая	Лейцин
8	0.62±0.02	0.61	1.46	розовая	Фенилаланин
9	0.95±0.02	0.05	12.20	желтая	Неидентифицированная зона
Извлечение из плодов облепихи крушиновидной					
1	0.08±0.02	10.11	-	розовая	Аргинин
2	0.14±0.02	6.14	1.65	розовая	Неидентифицированная зона
3	0.22±0.02	3.55	1.73	розовая	Неидентифицированная зона
4	0.26±0.02	2.85	1.25	оранжево-розовая	Пролин
5	0.36±0.02	1.78	1.60	малиновая	Глицин
6	0.40±0.02	1.50	1.19	сиреневая	Глутаминовая кислота
7	0.48±0.02	1.08	1.39	розовая	Валин
8	0.53±0.02	0.89	1.21	розовая	Лейцин
9	0.56±0.02	0.79	1.13	розово-сиреневая	Неидентифицированная зона
10	0.62±0.02	0.61	1.30	розовая	Фенилаланин
11	0.95±0.02	0.05	12.20	желтая	Неидентифицированная зона

Результаты расчета величины селективности сорбции свидетельствуют об удовлетворительном разделении хроматографических зон на хроматограмме и правомерности использования данной методики (табл. 1). Неидентифицированные

зоны АК, согласно литературным данным и результатам исследования аминокислотного состава анализируемого сырья методом капиллярного электрофореза (табл. 2), могут относиться к лизину ($R_f = 0.05 \pm 0.02$), аспарагиновой кислоте ($R_f = 0.16 \pm 0.02$), серину ($R_f = 0.15 \pm 0.02$) и тирозину ($R_f = 0.57 \pm 0.02$) [2]. В связи с тем, что хроматограммы извлечений из ЛРС имеют неодинаковый вид (рис. 1 и 2), мы предполагаем, что хроматографический профиль АК можно использовать для стандартизации сырья.

Таблица 2. Аминокислотный состав исследуемых объектов (в пересчете на абсолютно сухое сырье)

№ п/п	АК	Содержание АК, %	
		Листья крапивы двудомной	Плоды облепихи крушиновидной высушенные
1	Аргинин	1.23	1.17
2	Лизин*	1.07	0.49
3	Тирозин	0.78	0.35
4	Фенилаланин*	1.01	0.35
5	Гистидин	0.46	0.29
6	Лейцин*	1.59	0.60
7	Изолейцин*	0.90	0.41
8	Метионин*	0.30	0.06
9	Валин*	1.11	0.43
10	Пролин	1.03	0.49
11	Треонин*	1.22	0.41
12	Серин	1.27	0.60
13	Аланин	1.47	0.46
14	Глицин	1.19	0.44
15	Цистин	0.63	0.35
16	Глутаминовая кислота	1.96	1.60
17	Аспарагиновая кислота	2.99	3.33

*- незаменимая АК

Согласно данным табл. 2, преобладающими АК в ЛРС облепихи являются аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота, аргинин; в ЛРС крапивы двудомной - аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота, аргинин, лейцин, аланин, серин и треонин.

Заключение

Разработана методика разделения и идентификации АК методом ТСХ с двумерным элюированием в извлечениях из ЛРС на примере плодов облепихи крушиновидной и листьев крапивы двудомной. Проведена идентификация зон на хроматограммах. В изучаемом ЛРС с помощью разработанной методики обнаружены заменимые (аргинин, пролин, глицин, глутаминовая кислота) и незаменимые - протеиногенные АК (валин, лейцин, фенилаланин). Показана целесообразность стандартизации плодов облепихи крушиновидной и листьев крапивы двудомной по содержанию АК методом двумерной ТСХ.

Хроматографический профиль извлечений из ЛРС можно использовать для оценки доброкачественности сырья.

Список литературы

1. Соболева В.А., Чушенко В.Н., Коломиец А.А. Исследование аминокислотного состава гомеопатической матричной настойки каштана конского // Электронный журнал «Провизор». №17. 2010. <http://www.provisor.com.ua/>
2. Кхалед Абу Захер, Журавлев Н.С. Аминокислотный состав некоторых видов растений рода *Rumex L.* // Электронный журнал «Провизор». №21. 2001. <http://www.provisor.com.ua/>
3. Никифоров Л.А., Белоусов М.В., Фурса Н.С. Изучение аминокислотного состава ряски малой (*Lemna minor L.*). // Бюллетень сибирской медицины. №5. 2011. С. 74-77.
4. Круглова М.Ю., Круглов Д.С., Ханина М.А., Фурса Н.С. Полисахаридный и аминокислотный состав наиболее распространенных видов лабазника // Электронный журнал «Медицина и образование в сибире». №5. 2011. ngmu.ru/cozo/mos/
5. Анчеева Е.Ю. Сравнительный анализ состава свободных аминокислот некоторых видов рода *Stellaria L.* // Электронный журнал «Современные проблемы образования и науки». №2. 2013. <http://www.science-education.ru/>
6. Симонян А.В., Саламатов А.А., Покровская Ю.С., Аванесян А.А. Использование нингидриновой реакции для количественного определения α -аминокислот в различных объектах / Метод. реком. // Волгоград, 2007. 106 с.
7. Булаев В.М., Ших Е.В., Сычев Д.А. Безопасность и эффективность лекарственных растений. М.: Практическая медицина, 2013. 272 с.
8. Гейсс Ф. Основы тонкослойной хроматографии. М.: Мир, 1999. 405 с.
9. Рудаков О.Б., Востров И.А., Федоров С.В. и др. Спутник хроматографиста. Методы жидкостной хроматографии. Воронеж: «Водолей», 2004. 528 с.
10. ГОСТ 13496.21-87 Корма, комбикорма, комбикормовое сырье. Методы определения лизина и триптофана.
11. Комарова Н.В., Каменцев Я.С. Практическое руководство по использованию систем капиллярного электрофореза «Капель». СПб.: ООО «Веда», 2006. 212 с.

Тринева Ольга Валерьевна – к.фарм.н., доцент кафедры фармацевтической химии и фармацевтической технологии фармацевтического факультета ВГУ, Воронеж

Синкевич Анастасия Вячеславовна - студентка фармацевтического факультета ВГУ, Воронеж

Сливкин Алексей Иванович - д.фарм.н., профессор, зав. кафедрой фармацевтической химии и фармацевтической технологии, декан фармацевтического факультета ВГУ, Воронеж

Сафонова Елена Федоровна – к.х.н., доцент, заведующая кафедрой фармации последипломого образования ВГУ, Воронеж

Trineeva Olga V. - the candidate pharm. sciences, the senior lecturer to faculty of pharmaceutical chemistry and pharmaceutical technology of pharmaceutical faculty VGU, Voronezh, e-mail: trineevaov@mail.ru

Sinkevych Anastasia V. - a student at the pharmaceutical faculty VGU, Voronezh

Slivkin Alexey I. - the doctor pharm. sciences, the professor, manager of faculty of pharmaceutical chemistry and pharmaceutical technology, the dean of pharmaceutical faculty VGU, Voronezh

Safonova Elena F. - the candidate chemical. sciences, the senior lecturer, manager of faculty of Pharmacy Postgraduate Education VSU, Voronezh